OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA
LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

67.

G. LUCHETTI

Alcune ricerche sull' influenza esercitata da seleniti e telluriti sulla microflora

Estratto dal Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa
Volume VIII - Anno 1932

PISA
TIPOGRAFIA EDITRICE PACINI MARIOTTI

1932 - XI

G. LUCHETTI

Alcune ricerche sull' influenza esercitata da seleniti e telluriti sulla microflora

Estratto dal Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa
Volume VIII - Anno 1932

PISA
TIPOGRAFIA EDITRICE PACINI MARIOTTI

1932 - XI

G. LUCHETTI

Alcune ricerche sull' influenza esercitata da seleniti e telluriti sulla microflora

È noto quanto esaurientemente il Gosio trattò sulle bioreazioni dell' arsenico, del tellurio e del selenio [1]. Alla Memoria di tale Autore si rimanda per quanto concerne l'argomento e la letteratura relativa, estesamente riportata e commentata.

Posteriormente al lavoro di Gosio non pochi altri studi comparvero. Nel 1910 Korsakow [2] trovò che il seleniato di sodio inibisce l' attività della zimina, ma che d' altra parte accelera notevolmente, nelle proporzioni dello 0,5 %, la fermentazione del glucosio da parte di certi fermenti.

Nel 1914 King e Davis [3] accertarono la capacità di ridurre i sali di selenio e tellurio da parte di 16 forme batteriche, tre fermenti e due muffe: l' ottimo di concentrazione in cui la reazione si palesa varierebbe, secondo i microrganismi, tra 1 : 12.500 e 1 : 300.000. Davis (1914) dimostrò [4] che esistono differenze notevoli sulla resistenza che offrono diversi stipiti di bacilli del tifo di fronte al tellurito di potassio; stabilì anche le concentrazioni atte ad inibire lo svi-

luppo di alcune forme batteriche. Ancora nel 1914 Harden e Norris (5) trovarono che la presenza di zuccheri fermentescibili favorisce la riduzione dei seleniti da parte dei lieviti. Dox (6) concluderebbe che i gas che si sviluppano da colture contenenti tellurio e selenio sono probabilmente derivati alchilici corrispondenti a dietilarsine.

Nel 1916 Brenner descrisse (7) un *Micrococcus selenicus* isolato dal fondo di sorgenti marine, che in modo singolarmente rigoglioso vegeterebbe in presenza di sali di selenio.

Nel 1920-21 Joachimogen (8) trovò che il bacillo della difterite può svilupparsi in substrati contenenti tellurito in concentrazione 4000 volte superiore a quella sopportata dal batterio del tifo; e che, eccetto in apparenza per il bacillo difterico, i microbi in genere risentono più della tossicità del tellurio che non del selenio.

Nel 1922 Douglas coltivò (9) con successo il bacillo della difterite allestendo colture a piatto con agar al siero tripsinizzato contenente tellurito 1 : 6000.

Nel 1923 Megrail (10) usò siero agarizzato con tellurito di potassio 1 : 5-10.000.

Nel 1925 Levine studiò (11) 16 spoluranti anaerobi capaci di ridurre il selenito di sodio: cosa assai dubbia secondo alcuni, tra cui Hall (12), il quale ritiene le colture di Levine inquinate da *Clostridium sporogenes.*

Nel 1927 Gilbert e Humphreys (14), riprendendo lo studio dell' isolamento del b. difterico, trovarono che buoni risultati si ottengono impiegando tellurito di potassio nella concentrazione di 1 : 17000 e studiarono inoltre gli effetti del tellurito nelle proporzioni di 1 : 34000 in alcune specie di batteri, di fermenti, e su *Aspergillus niger.*

* * *

Sul comportamento che i microbi del suolo assumono di fronte ai sali di selenio e tellurio, come sull' influenza da questi esercitata su alcune attività biochimiche dipendenti, non mi consta che sia comparso alcun lavoro, a differenza dell' altro metalloide, l' arsenico, l' azione del quale è stata assai estesamente indagata ([14]).

Le ricerche che qui si riferiscono hanno appunto lo scopo di contribuire alla conoscenza delle azioni che seleniti e telluriti esercitano sulla flora microrganica, specialmente del terreno agrario.

PARTE SPERIMENTALE

I. - Influenza del selenito e tellurito di potassio sullo sviluppo microrganico.

Per tali prove mi valsi del seguente liquido colturale:

acqua distillata	1000
tartrato ammonico	2
fosfato bipotassico	2
glucosio	5
cloruro sodico solfato potassico	tr.

che distribuii in recipienti da 1000 cc. e in ragione di cc. 250 a recipiente.

Alcuni furono lasciati di controllo: in altri fu aggiunto o selenito o tellurito di potassio nelle proporzioni di 1/25000,

1/50000, 1/75000, 1/100000. Sterilizzai per autoclave, inoculai con cc. 1 dello stemperamento acquoso, in parti uguali di buona terra da giardino e coltivai in termostato a 24°C. Trascorsi 7 giorni di coltura contai i germi presenti in un'aliquota del liquido colturale ($\frac{1}{2}$ cc.) mediante la numerazione delle colonie sviluppatesi su piastre allestite all' agar-fagiuoli.

Risultò:

	N. di germi in cc. 0,5 del liquido colturale	
Controllo	13.170	
	selenito:	tellurito:
1 : 100000	59.800	264.000
1 : 75000	144.400	137.000
1 : 50000	100.800	6.000
1 : 25000	150.000	810

Essi indicherebbero che piccole concentrazioni di tellurito e concentrazioni anche maggiori di selenito stimolerebbero la moltiplicazione dei germi. L' effetto stimolante non appare pertanto proporzionale alle concentrazioni; ma qui è da porre in rilievo che, per attività microbica, precipita dai sali, come è noto, il rispettivo metallo ed in conseguenza a tale circostanza lo sviluppo stesso può diversamente venire influenzato.

Fu insistito ancora nella ricerca e, ripetuta la prova con le identiche modalità della prima — salvo avere contenuto le concentrazioni dei sali entro i limiti compresi tra lo 1/1000 e 1/10000 — risultò:

	N. dei germi in cc. 0,5 del liquido colturale	
Controllo	11.250	
	selenito:	tellurito:
1 : 10.000	7.250	8.000
1 : 5.000	4.250	309
1 : 1.000	46	249

In tal caso fu evidente l' influenza negativa esercitata dalle concentrazioni relativamente elevate.

Ripetei ancora l' indagine, sempre con le precedenti modalità, aggiungendo i sali nei liquidi di coltura nelle proporzioni comprese tra 1/1000 e 1/100000; ma, anzichè contare i germi sviluppati soltanto al settimo giorno, li contai al settimo e al quindicesimo per accertarmi di un'eventuale ripresa vegetativa di quelli capaci di tollerare le concentrazioni maggiori.

	N. dei germi in cc. 0,5 del liquido colturale al 7° giorno		al 15° giorno	
Controllo	800.000		2.500.000	
	selenito	tellurito	selenito	tellurito
1 : 100000	800.000	600.000	2.400.000	8.000.000
1 : 75000	650.000	400.000	2.000.000	5.000.000
1 : 50000	450.000	500.000	1.500.000	6.750.000
1 : 25000	350.000	500.000	880.000	4.500.000
1 : 10000	250.000	200.000	800.000	2.500.000
1 : 5000	40.000	170.000	600.000	250.000
1 : 1000	20.000	32.000	200.000	130.000

Da queste prove risulta che:

1° selenito e tellurito di potassio, in piccole concentra-

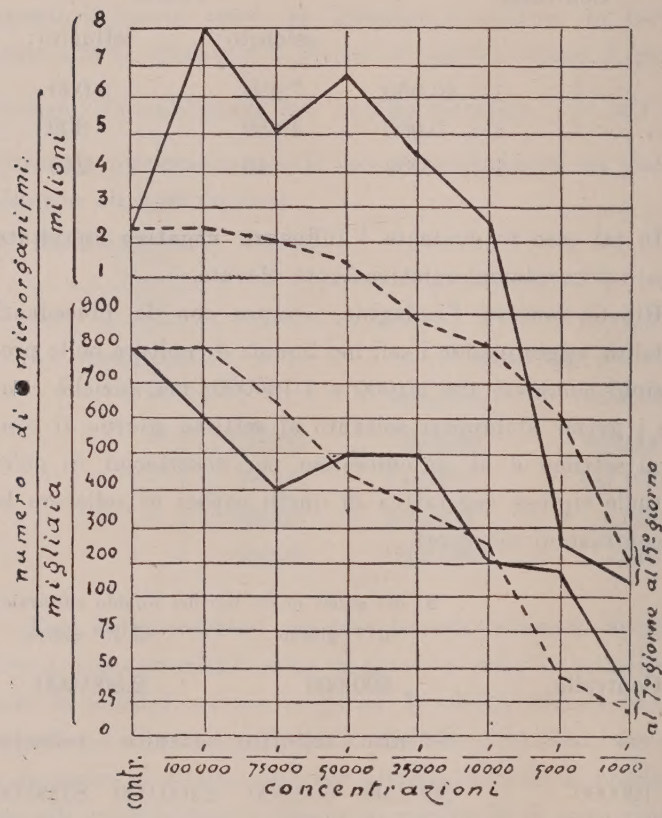


Fig. 1. — *Diagramma dello sviluppo microrganico in presenza di varie concentrazioni di tellurito* (—) *e selenito.* (- - - -)

zioni, possono più ó meno prontamente stimolare la riproduzione dei germi;

2° il numero di questi si presenta in relazione alle quantità di sali aggiunti per modo che, a concentrazioni maggiori, fanno riscontro numeri minori;

3° la concentrazione pari all' 1 $^0/_{00}$, che può ritenersi forte dato l'elevato p. a. degli anioni, non inibisce completamente lo sviluppo microbico, il quale anzi continua a progredire con il tempo, pur mantenendosi sempre inferiore a quello che ha riscontro nei liquidi contenenti minori quantità di sali (*);

4° in ogni caso e per ogni concentrazione si ha riduzione dei sali con precipitazione del metallo.

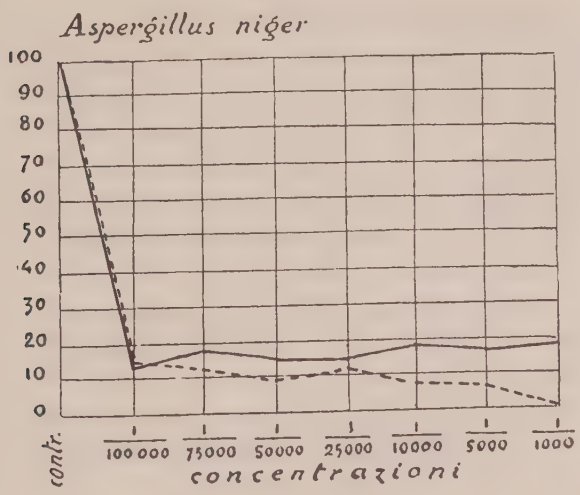
II. - Influenza del selenito e tellurito di potassio sullo sviluppo di alcuni Funghi.

La presente ricerca fu eseguita sopra alcuni funghi di collezione che coltivai per 15 giorni a 28° C. in liquido di Raulin addizionato o meno dei sali in esperimento e contenuto in piccole bevute.

Lo sviluppo fu seguito giorno per giorno; al quindicesimo i feltri fungini furono essiccati a 105-110° C. fino a costanza di peso, indi pesati. Si ottenne:

(*) Apparì interessante la determinazione delle forme presenti nei liquidi contenenti tellurito e selenito all' 1 $^0/_{00}$. Rinvenii frequentemente tra le principali, *Micr. roseus* (Bumm) L. et N., *Micr. albus* Matz., *Micr. flavus* (Flügge) L. et N., *Bact. discoformans* Zopf., *Bact. fluorescens* (Fl.) L. et N. *Bact. turcosum* (Zimm.) L. et N., *Bact. brunneum* Copeland, *Proteus vulgaris* Hauser.

		Controllo	Tellurito di potassio							Selenito di potassio						
			1/100000	1/75000	1/50000	1/25000	1/10000	1/5600	1/1000	1/100000	1/75000	1/50009	1/25000	1/10000	1/5000	1/1000
Aspergillus niger	Peso del corpo fungino, gr:	1.645	0.223	0.290	0.245	0.240	0.310	0.280	0.310	0.212	0.182	0.152	0.197	0.130	0.122	tr.
	Riferito a 100:	100	12.7	17 —	14.6	14.6	18.8	17 —	18.8	12.88	11.06	9.23	11.91	7.81	7.35	—
Aspergillus varians	Peso del corpo fungino, gr:	2.222	0.828	0.533	0.435	0.560	0.607	0.750	0.700	0.880	0.900	0.925	0.800	0.332	0.225	tr.
	Riferito a 100:	100	37.26	23.98	19.57	25.20	27.31	33.75	31.50	40 —	40.9	42.04	36.36	15.09	10.22	—
Penicillium crustaceum	Peso del corpo fungino, gr:	1.837	0.912	0.427	0.315	0.315	0.220	0.165	0.150	0.490	0.218	0.235	0.395	0.300	0.255	tr.
	Riferito a 100:	100	50.66	29.27	17.5	17.5	12.22	9.17	8.33	27,22	12.11	13.05	21.94	16.66	14.16	—
Acrostalagmus cephalosporioides	Peso del corpo fungino, gr:	0.596	0.360	0.397	0.355	0.223	0.297	0.215	0.203	0.275	0.184	0.185	0.170	0.075	0.045	tr.
	Riferito a 100:	100	61.01	67.28	60.17	37.96	50.34	36.44	33.96	46.61	31.19	31.19	28.81	12.71	7.62	—
Cladosporium herbarum	Peso del corpo fungino, gr:	0.450	0.320	0.331	0.363	0.340	0.341	0.306	0.206	0.434	0.304	0.321	0.215	0.042	tr.	tr.
	Riferito a 100:	100	71.11	73.55	80.66	75.55	75.55	68 —	45.77	96.44	67.55	71.11	47.77	9.33	—	—
Macrosporium commune	Peso del corpo fungino, gr:	0.327	0.166	0.157	0.163	0.149	0.145	0.128	0.114	0.160	0.158	0.139	0.118	0.87	tr.	tr.
	Riferito a 100:	100	50.30	47.57	49.39	45.15	43.93	38.79	34.54	48.48	47.87	42.12	35.75	26.36	—	—
Botrytis cinerea	Peso del corpo fungino, gr.	2.593	1.820	1.220	1.212	1.007	0.985	0.390	0.239	1.722	1.205	1.120	0.695	0.605	0.395	0.145
	Riferito a 100:	100	70 —	46.95	46.54	38.73	37.88	15 —	9.19	66.23	46.34	43.08	26.73	23.26	15.19	5.57



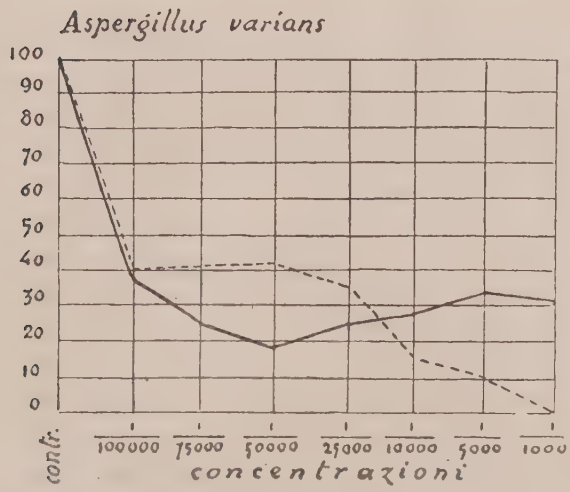
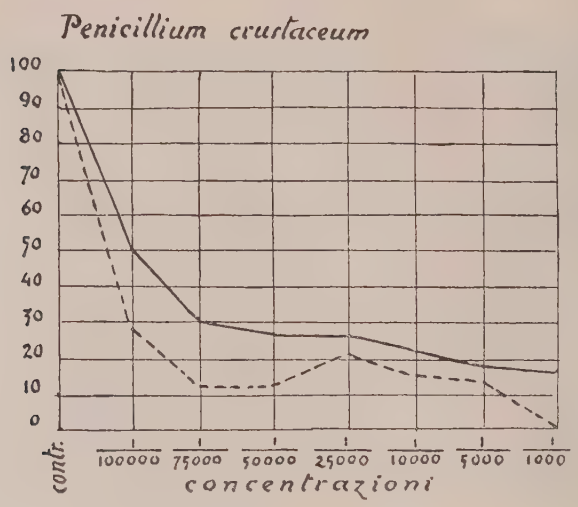


Fig. 2. — *Diagrammi dello sviluppo fungino in soluzioni contenenti tellurito* (—) *e selenito* (----).


Penicillium crustaceum
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
contr.
1/100000
1/75000
1/50000
1/25000
1/10000
1/5000
1/1000
concentrazioni

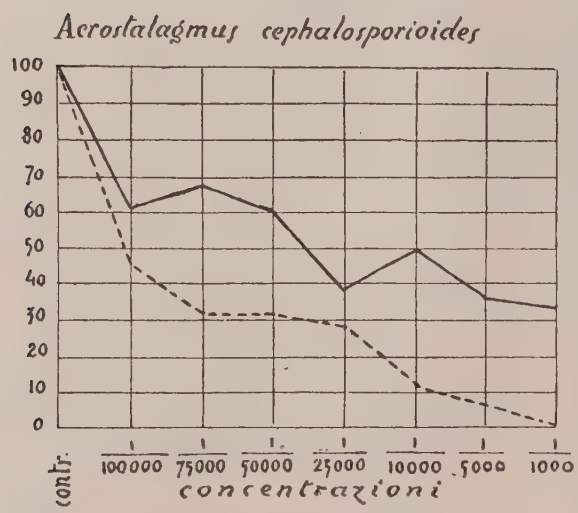
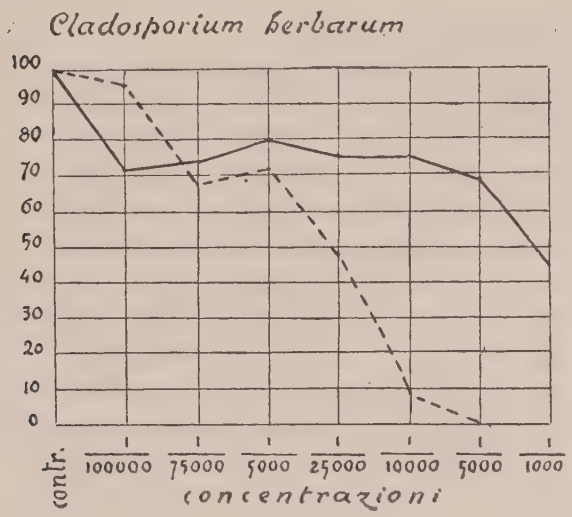

Acrostalagmus cephalosporioides
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
contr.
1/100000
1/75000
1/50000
1/25000
1/10000
1/5000
1/1000
concentrazioni

Fig. 2. — *Idem.*


Cladosporium herbarum
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
contr.
1/100000
1/75000
1/5000
1/25000
1/10000
1/5000
1/1000
concentrazioni

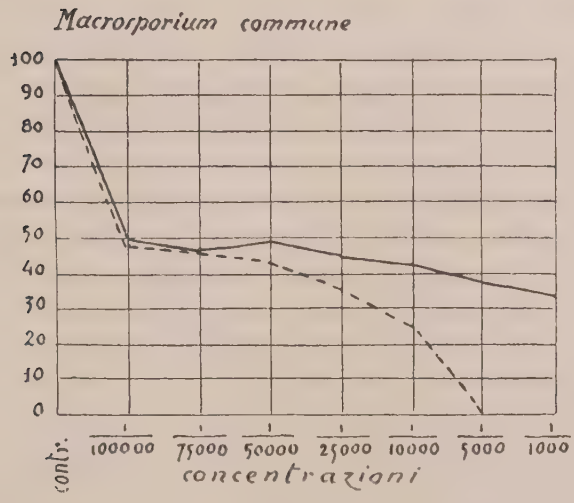

Macrosporium commune
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
contr.
1/100000
1/75000
1/50000
1/25000
1/10000
1/5000
1/1000
concentrazioni

Fig. 2. — *Idem.*

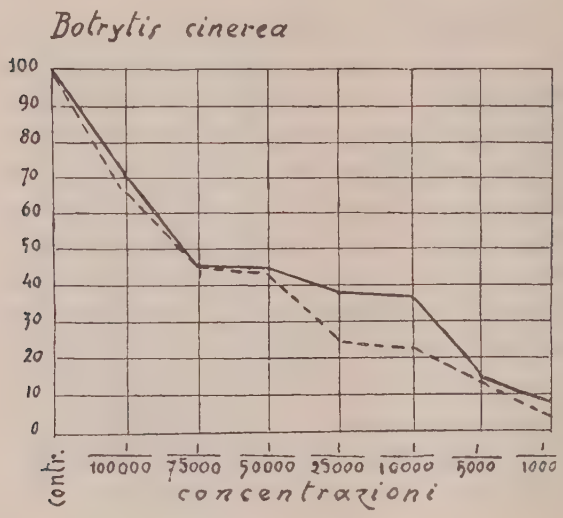


Fig. 2. — *Idem.*

Risulta evidente, in ogni caso, la negativa influenza esercitata dal selenito e dal tellurito sullo sviluppo degli ifomiceti cimentati: ciò per qualsiasi concentrazione. E risulta inoltre una maggiore tossicità del selenito rispetto al tellurito potassico, mentre tutti i funghi in esame precipitarono il metalloide dalle soluzioni dove era contenuto.

La mancata azione stimolante del selenito e tellurito nelle concentrazioni minimali sui funghi in esperimento — azione dimostratasi, invece, per gli Schizomiceti — non può destare sorpresa, in quanto già altra volta venne dato di ammettere ([15]) che, a parità di concentrazione, l' effetto stimolante di un determinato elemento o composto può verificarsi per alcune forme e non per altre rispetto alle quali anzi può apparire anche tossico in relazione al loro stato di organizzazione e differenziazione.

III. - Influenza del selenito e tellurito di potassio sui poteri di ammonizzazione e nitrificazione.

Ammonizzazione. — Questa, come il potere di nitrificazione, fu determinata aggiungendo i composti in esperimento ai liquidi di coltura normali usati per tali ricerche. Le prove furono allestite inoculando, con cc. 10 di $\frac{50 \text{ terra}}{500 \text{ acqua}}$ cc. 50 di soluzione all' 1.5 % di peptone Witte contenuto in beutine da 100 cc. Furono queste mantenute a 28° C. per quattro giorni, al termine dei quali si distillarono su magnesia usta, cc. 10 del liquido di coltura. L' ammoniaca formatasi risultò essere:

	NH_3: gr. per litro di soluzione	
Controllo	0.1932	
	selenito:	tellurito:
1 : 100000	0.4576	0.1531
1 : 75000	0.4690	0.1439
1 : 50000	0.4052	0.0428
1 : 25000	0.4052	0.0210
1 : 10000	0.2300	0.0135
1 : 5000	0.1568	0.0050
1 : 1000	—	—

Risulterebbe una decisa azione sfavorevole per il tellurito, ed invece un' azione stimolante, entro certi limiti, per il selenito potassico che non tarderebbe anch' esso, però, a farsi risentire dannoso oltre la concentrazione di 1 : 5000.

Per l' uno e per l' altro tuttavia la concentrazione 1 : 10000 ostacolerebbe completamente la formazione di ammoniaca.

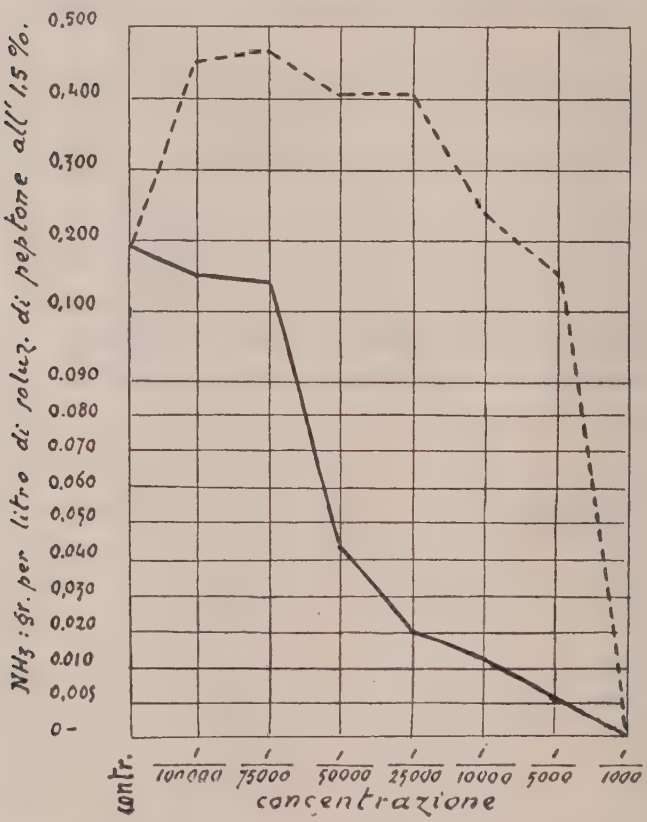


Fig. 3. — *Diagramma del processo di ammonizzazione in presenza di tellurito (—) e selenito (----).*

Quello che non appare molto chiaro è il diverso comportamento dei due sali; ma è da avvisare come nella soluzione di peptone si formasse per aggiunta di tellurito un

precipitato fioccoso più o meno abbondante secondo le maggiori o minori quantità di sale aggiunto. La probabile formazione di un organato complesso od anche altre modificazioni del mezzo nutritivo, possono avere influito nel senso di rendere meno attaccabile, indi ammonizzabile, il peptone.

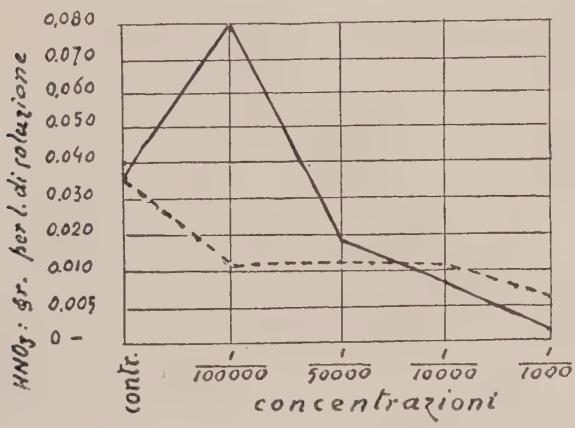


Fig. 4. — *Diagramma del processo di nitrificazione in presenza di tellurito* (—) *e selenito* (----).

Nitrificazione. — Diversamente svolgonsi i fatti per la nitrificazione:

	HNO_3: gr. per litro di soluzione: (*)	
Controllo	0.0350	
	selenito	tellurito
1 : 100000	0.0166	0.0800
1 : 50000	0.0166	0.0190
1 : 10000	0.0150	0.0085
1 : 1000	0.0060	0.0012

(*) Medie desunte dalla media di tre determinazioni.

Il tellurito, cioè, stimolerebbe il potere di nitrificazione se aggiunto in piccolissima dose, mentre il selenito, in ogni caso, deprimerebbe l'attività nitrificante, la quale risulta scarsissima qualora la concentrazione dei sali raggiunga l'1 %.

* * *

Riassumendo, i risultati delle presenti ricerche, riferentisi unicamente a colture in mezzi artificiali, dimostrano:

1. Selenito e tellurito potassico agiscono, per piccole somministrazioni, stimolando più o meno prontamente lo sviluppo della cellula batterica; oltre certi limiti, tale stimolazione cessa, mentre subentrano azioni tossiche i cui effetti sono in rapporto alla concentrazione dei sali.

2. Selenito e tellurito potassico agiscono sfavorevolmente anche in piccole concentrazioni (1/100000) sullo sviluppo di alcuni ifomiceti; il selenito in ogni caso dimostrebbesi piú tossico del tellurito.

3. Sul potere di ammonizzazione il selenito agirebbe, entro certi limiti, favorevolmente, mentre il tellurito, per reazioni secondarie che si determinano nel mezzo, agirebbe ostacolando la formazione di ammoniaca.

4. Il potere nitrificante sarebbe invece stimolato dal tellurito soltanto per minime dosi; ed ostacolato dal selenito potassico.

Ringrazio il Dott. O. Verona per la cortese assistenza prestata a questo mio lavoro.

Dal Laboratorio di Batteriologia
del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa
settembre 1932 - X

NOTE CITATE

(1) Gosio B. — *Studi sulle bioreazioni dell'arsenico, tellurio e selenio.* Roma, 1907.

(2) Korsakow N. — *Ueber die Wirkung des Natriumselenits auf die Ausscheidung der Kohlensäure lebender und abgetöteter Hefe.* Ber. Deut. Bot. Gesell., *28:* 334-338.

(3) King W. E. e Davis L. — *Potassium tellurite as an indicator of microbial life.* Amer. Jour. Pub. Health, *4:* 917-932.

(4) Davis L. — *A study of the tellurite reaction with the colon-typhoid group and other organisms.* Centr. Bakt., Abt. 1, 75, 180-192.

(5) Harden A. e Norris R. V. — *The enzymes of washed zymin and dried yeast (Lebedeff). II Reductase.* Biochem. Journ. *8:* 100-106.

(6) Dox A. W. — *A review of recent investigations on the mineral nutrition of fungi.* Biochem. Bull. *3:* 222-228.

(7) Brenner W. — *Züchtungsversuche einiger in Schlamnlebenden Bakterien auf selenhaltigem Nährboden.* Jahrb. Wiss. Bot. (Pringshein) *57:* 95-127.

(8) Joachimogen G. — *Zur Pharmakologie des Selens und Tellurs. I Die Wirkung ihrer Säuren auf Bakterien.* Biochem. Ztschr., *107:* 300-312.

Idem e Hirose W. — *Zur Pharmakologie des Selens und Tellurs Die Wirkung ihrer Säure auf Diphtheriebacillen.* Id., *125:* 1-11.

(9) Douglas S. R. — *A new medium for the isolation of B. diptheriae.* Brit. Journ. Expt. Path., *3:* 263-267.

(10) Megrail E. — *Modification of Klein medium for isolation of the diphteria bacillus.* Jour. Infect. Diseases, *33:* 466-469.

(11) Levine V. E. — *The reducing properties of microörganism with special reference to selenium compounds.* Jour. Bact., *10:* 217-262.

(12) Hall J. C. — *The reduction of selenium compounds by sporulating anaerobes.* Journ. Bact., *11:* 407-408.

(13) Gilbert R. e Humphreys E. M. — *The use of potassium tellurite in differential media.* Journ. Bact., *11:* 141-151.

(14) — Per la bibliografia al riguardo vedi:

Verona O. e Ferretti C. — *L'azione dello jodio e dello joduro potassico nella nutrizione dei microrganismi del terreno agrario.* Atti Soc. Tosc. di Sc. Nat. Pisa, 1931.

(15) Verona O. e Ferretti C. — *Op. cit.*